

**СТИМУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ КАЛЛУСНЫМИ
КУЛЬТУРАМИ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ И ЭХИНАЦЕИ БЛЕДНОЙ
В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

НЕСТЕР Гражина Владимировна, *студент*
ДИТЧЕНКО Татьяна Ивановна, *к.б.н., доцент*
Белорусский государственный университет

Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L. Moench) относится к числу фармакопейных растений, содержащих фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты и их производные) в качестве ведущей группы биологически активных соединений. Наиболее характерный компонент – цикориевая кислота, обуславливающая иммуномодулирующую и противовирусную активность препаратов на основе сырья данного растения [1]. К сопутствующим фенилпропаноидам относят ко-

фейную и хлорогеновую кислоту. Наряду с эхинацеей пурпурной значительный интерес представляет эхинацея бледная (*Echinacea pallida* (nut.) Nutt.), корни которой являются фармакопейным сырьем ряда европейских стран [2]. Каллусные культуры эхинацеи пурпурной сохраняют способность интактного растения к синтезу таких фенилпропаноидов как цикориевая, кафтаровая, хлорогеновая кислоты, и, следовательно, представляют собой альтернативный природному сырью биотехнологический источник фитопрепаратов с иммуномодулирующей активностью [3]. При этом актуальным является поиск условий культивирования, способствующих возрастанию продукции фенилпропаноидов культурами клеток представителей рода *Echinacea*.

Минеральный состав сред питательных сред для культур растительных клеток и тканей оказывает большое влияние на синтез вторичных метаболитов, при этом наиболее важно содержание такого макроэлемента как азот. Биосинтетическая активность культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей зависит от соотношения неорганических форм азота – NH_4^+ и NO_3^- . Изменение оптимального соотношения данных ионов, как в сторону увеличения, так и снижения поразному воздействует на ростовые процессы и накопление вторичных метаболитов [4, с. 192].

Целью настоящей работы явилось исследование зависимостей уровней накопления гидрокси-коричных кислот и их производных в каллусных культурах *E. purpurea* и *E. pallida* при снижении концентрации аммонийного и нитратного азота в питательной среде.

Объектами исследования служили длительно пассируемые каллусные культуры указанных лекарственных растений, полученные из листовых эксплантов. В работе использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга (МС), которая отличается от других сред для культивирования растительных клеток и тканей очень высоким содержанием аммонийного и нитратного азота. В контроле культивирование каллусов осуществлялось на питательной среде МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты, 8 г/л агар-агара. Опытные варианты питательных сред представляли собой модификации указанной среды, для которых было характерно снижение вдвое концентрации ионов NO_3^- (вариант 1), исключение нитратного азота (вариант 2), исключение аммонийного азота на фоне 40 ммоль/л NO_3^- (вариант 3), исключение аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- (вариант 4), а также одновременное исключение обоих источников азотного питания (вариант 5). При приготовлении опытных вариантов производилась замена KNO_3 на KCl (для исключения нитрата и сохранения калия), NH_4NO_3 на NH_4Cl (для исключения нитрата и сохранения аммония), NH_4NO_3 на NaNO_3 (для исключения аммония и сохранения нитрата). Культивирование каллусов осуществляли в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 25°C. Продолжительность ростового цикла составляла 30-32 сут. Для определения суммы гидрокси-коричных кислот и их производных использовали метод прямой спектрофотометрии [5]. Оценку прироста биомассы каллусных тканей и уровней накопления в них целевых фенилпропаноидов производили в стационарную фазу ростового цикла.

При изучении закономерностей прироста биомассы каллусной культуры *E. purpurea* в условиях дефицита азота в питательной среде было установлено, что уменьшение вдвое концентрации нитрата (от 40 ммоль/л до 20 ммоль/л) не приводило к изменению индекса роста культуры. При полном исключении нитратного азота либо одновременном исключении обоих форм азотного питания индекс роста каллусов уменьшался более чем в 2 раза относительно контроля. В случае каллусной культуры *E. pallida* отсутствие в питательной среде NH_4^+ не приводило к замедлению прироста биомассы каллусов, если концентрация нитрат-ионов составляла 40 и 20 ммоль/л. При полном исключении из питательной среды аммонийного и нитратного азота индекс роста каллусов снижался более чем в 3 раза по сравнению с контролем.

Количественное определение содержания гидрокси-коричных кислот и их производных в водно-спиртовых экстрактах из каллусной культуры *E. purpurea* показало, что резкое повышение уровней их накопления происходит при использовании безаммонийных вариантов питательных сред. Максимальный стимулирующий эффект отмечался в присутствии в среде 20 ммоль/л нитрата в качестве единственного источника азота (вариант 4). В этом случае уровни накопления гидрокси-коричных кислот были более чем в 4 раза выше по сравнению с контролем. При уменьшении вдвое концентрации нитратного азота в питательной среде МС на фоне 20 ммоль/л ионов аммония содержание гидрокси-коричных кислот и их производных в каллусах *E. purpurea* снижалось в 1,4 раза. В условиях полного отсутствия источников азотного питания содержание анализируемых фенилпропаноидов в исследуемой каллусной культуре было в 1,6 раза ниже относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют о непригодности безнитратных питательных сред для культивирования каллусов *E. purpurea*.

Уровни накопления гидроксикоричных кислот в каллусной культуре *E. pallida*, выращиваемой на полной питательной среде МС, были в среднем в 2,5-3 раза ниже по сравнению с каллусами *E. purpurea*. В условиях дефицита азота их содержание в наибольшей степени повышалось при исключении ионов аммония из питательной среды МС, т.е. в присутствии 40 ммоль/л NO_3^- (вариант 3). Стимулирующий эффект достигал в среднем 1,5 раза. Достоверное возрастание содержания гидроксикоричных кислот наблюдалось и в случае полного исключения аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- (в 1,3 раза относительно контроля). В аналогичных условиях рост уровней накопления гидроксикоричных кислот в каллусах *E. purpurea*, как отмечалось ранее, был гораздо выше. Следовательно, каллусная культура *E. pallida* оказалась менее подверженной регуляторному влиянию дефицита источников азотного питания по сравнению с каллусной культурой *E. purpurea*.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что для повышения продукции гидроксикоричных кислот каллусами *E. purpurea* целесообразно полное исключение аммонийного азота на фоне 20 ммоль/л NO_3^- , а в случае каллусов *E. pallida* использование 40 ммоль/л NO_3^- в качестве единственного источника азота. На указанных вариантах питательных сред отмечалась выраженная стимуляция биосинтетического потенциала культур при полном сохранении их ростовой активности. Можно предположить, что отсутствие аммония, который играет важнейшую роль в процессах биосинтеза белка как ключевого компонента первичного метаболизма, приводит к изменению баланса между реакциями первичного и вторичного обмена веществ в сторону последнего. Для исследуемых каллусных культур это выражается в стимуляции накопления таких вторичных метаболитов как фенилпропаноиды.

Список использованных источников

1. Фитохимический состав представителей рода эхинацея и его фармакологические свойства / А. В. Самородов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – Т. 30, № 4. – С. 32-37.
2. Кисличенко, В. С. Эхинацея бледная — *Echinacea pallida* (nutt.) Nutt. Аналитический обзор / В. С. Кисличенко, А. В. Дьяк, О. М. Кошевой // Провизор. – 2008. – № 8. – С. 18-29.
3. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea* / Т. И. Дитченко [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 55-63.
4. Endress, R. Plant Cell Biotechnology / R. Endress. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. – 353 p.
5. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* / В. А. Куркин [и др.] // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, Вып. 2. – С. 81-85.